

Aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin
und der Poliklinik für Berufskrankheiten
der Universität Erlangen - Nürnberg
(Direktor: Professor Dr. med. H. Valentin)

Die Aktivität der Glutathion-Peroxidase von Plasma und Erythrozyten bei beruflicher Selen-Exposition

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Friedrich Frank
aus Ehingen

1980

Aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin
und der Poliklinik für Berufskrankheiten
der Universität Erlangen - Nürnberg
(Direktor: Professor Dr. med. H. Valentin)

Die Aktivität der Glutathion-Peroxidase von Plasma und Erythrozyten bei beruflicher Selen-Exposition

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Friedrich Frank
aus Ehingen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Prof. Dr. H. Valentin

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 12. 1980

Meinen Eltern

Herrn Prof. Dr. med. H. Valentin danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.

Herrn Dr. med. R. Schiele und Herrn Chem. Ing. K.-H. Schaller bin ich für Beratung und Unterstützung bei allen Problemen besonders dankbar.

Herrn Dipl.-Phys. D. Weltle sei für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung sowie allen Damen und Herren des Labors für ihre beständige Hilfsbereitschaft gedankt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	4
Kollektive	4
Selenbestimmung	4
Messung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität	4
III. ERGEBNISSE	10
IV. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN	18
V. METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BESTIMMUNG DER GLUTATHION-PEROXIDASE-AKTIVITÄT	23
Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der eingesetzten HämolySATkonzentration und der Plasmamenge	23
Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der NADPH ₂ -Konzentration	24
Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Glutathion-Konzentration	24
Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Cumolhydroperoxidkonzentration	25
Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur	27
Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert	28
VI. ZUSAMMENFASSUNG	30
VII. LITERATURVERZEICHNIS	31



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. EINLEITUNG

Selen hat bisher nur eine geringe arbeitsmedizinische Bedeutung erlangt. Berufsbedingte Selenvergiftungen sind in der Literatur nur vereinzelt beschrieben worden. Es handelte sich dabei zumeist um die Folgen einer akuten Einwirkung von Selenoxiden oder Selenwasserstoff (KAYSSER 1965). Sie sind durch asthmatische Beschwerden, evtl. Lungenödeme und passagere Leberschäden gekennzeichnet.

Das Bild der chronischen Selenvergiftung ist uncharakteristisch. Nach SCHROEDER u. Mitarb. (1970) werden Verfärbungen und degenerative Veränderungen der Zähne, Gelbfärbung der Haut, Dermatitis, chronische Arthritis, atrophische und brüchige Fingernägel, Ödeme, Magen-Darm-Beschwerden sowie in einigen Fällen Abgeschlagenheit und neurologische Beschwerden beobachtet. Mitunter kommt es zu einem teilweisen Verlust von Haaren und Fingernägeln.

Akute Selenvergiftungen sind ggf. als Arbeitsunfälle zu entschädigen. Etwaige Folgen einer chronischen Selen-Einwirkung sind nach der gültigen Berufskrankheiten-Verordnung nicht entschädigungspflichtig. Aber auch Meldungen oder Anerkennungen nach § 551 Abs. 2 der Reichsversicherungsordnung sind bisher in der BRD nicht erfolgt.

Größere Bedeutung scheint Selen als essentielles Spurenelement zu besitzen. Sichere Mangelerkrankungen konnten beim Menschen bisher nicht festgestellt werden. Seit einiger Zeit wird Selen vor allem aber eine Schutzwirkung gegen verschiedene häufige Krebserkrankungen zugesagt. Nach den Untersuchungen von SHAMBERGER u. Mitarb. (1976) und SCHRAUZER u. Mitarb. (1977) besteht eine reziproke Beziehung zwischen dem Selengehalt der Nahrung bzw. des Blutes und der regionalen alterskorrigierten Mortalität an den als Typ A bezeichneten Tumoren. Hierzu werden die Carcinome von Colon, Rectum, Lungen und der Atemwege gerechnet. Diese Schutzwirkung ist bisher als Arbeitshypothese

zu werten. Sie kann noch nicht als gesicherte Erkenntnis angesehen werden.

Im Tierversuch wurde für Selen eine antikarzinogene und im Ames-Test eine antimutagene Wirksamkeit festgestellt (JAKOBS 1977).

Die einzig gesicherte Funktion des Selens im Säugetierorganismus und beim Menschen ist seine Beteiligung an dem Enzym Glutathion-Peroxidase (GSH-Px; EC 1.11.1.9), dessen prosthetische Gruppe es darstellt (STADTMAN 1974). Es wird vermutet, daß das Enzym den Abbau von Hydroperoxiden und Peroxiden der Fettsäuren katalysiert und dadurch eine oxydative Schädigung biologischer Membranen verhindert. Der hypothetische Reaktionsmechanismus ist in Abb. 1 dargestellt:

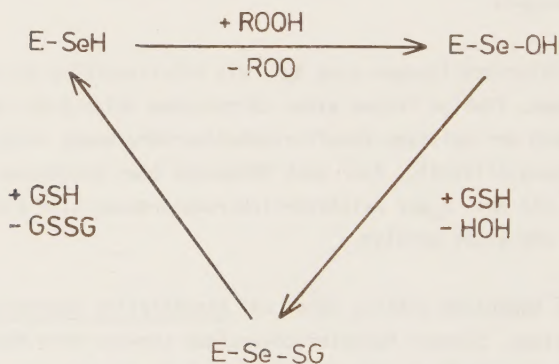


Abb. 1: Reaktionsmechanismus der Glutathion-Peroxidase nach GANTHER u. Mitarb. (1974)

Die aktive Seite der GSH-Px ($E-SeH$) wird durch Peroxide (ROO) oxidiert ($E-Se-OH$). Im zweiten Abschnitt reagiert die oxidierte Form des Enzyms mit Glutathion (GSH). Dabei entsteht ein Selenosulfidabschnitt des Enzyms ($E-Se-SG$) und ein Molekül H_2O . Im dritten Teil wird die Selenosulfidbindung durch ein zweites GSH-Molekül gespalten, wobei oxidiertes GSH ($GSSG$) entsteht und die Ausgangsform ($E-SeH$) wiederhergestellt ist.

Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen der Enzymaktivität in den Erythrozyten und im Blutplasma und der Blut-Selen-Konzentration verliefen widersprüchlich. SCHRAUZER u. Mitarb. (1978) und SCHMITT u. HELLER (1976) konnten keine Korrelationen zwischen der Blut-Selen-Konzentration und der Aktivität des Enzyms in der Erythrozyten feststellen. In verschiedenen anderen Studien hat sich die Aktivität dieses Enzyms im Blutplasma und in den Erythrozyten hingegen als brauchbarer Indikator des Selenstatus, insbesondere eines Selenmangels, erwiesen (OMAYE u. TAPPEL 1974, THOMSON u. Mitarb. 1977, PERONA u. Mitarb. 1977, SIVERTSEN u. Mitarb. 1977, LOMBECK u. Mitarb. 1977 u. 1978, MCKENZIE u. Mitarb. 1978).

Untersuchungen bei beruflich gegenüber Selen exponierten Personen standen bisher noch aus.

II. MATERIAL UND METHODEN

Kollektive:

Es konnten 14 gesunde Arbeiter einer Fabrik für Reinselenherstellung mit im Mittel 10-jähriger beruflicher Exposition gegenüber Selen und anorganischen Selenverbindungen untersucht werden. Bei allen Personen wurden die Enzymaktivitäten der GSH-Px von Plasma und Erythrozyten sowie der Selenspiegel im Blut und im Urin ermittelt. Zum Vergleich wurden 65 gesunde Personen ohne berufliche Selen-Exposition auf dieselben Parameter untersucht.

Selenbestimmung:

Die Konzentration des Selens im Plasma und im Urin wurde nach Hydridbildung mittels der sogenannten kalten, flammenlosen Atomabsorption in einer geringfügigen Modifikation der von SCHALLER u. SCHWEIGER (1978) angegebenen Methode bestimmt. Durch die Verwendung von Salzsäure an Stelle von Schwefelsäure konnten die Untergrundeffekte verringert werden. Die Natriumborhydridkonzentration wurde von 2 % auf 4 % erhöht. Die Messung erfolgte mit dem Atomabsorptionsspektrometer PERKIN-ELMER Typ 402 mit Untergrundkompensation und dem Hg/As/Se-Zusatzgerät der Firma BECKMAN. Die Selenkonzentrationen des Urins wurden auf die Kreatininkonzentrationen relativiert.

Messung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität:

Die Enzymaktivität der GSH-Px von Plasma und Erythrozyten wurde in einer eigenen Modifikation * der Methode von GÖNZLER u. Mitarb. (1974) bestimmt. Es handelt sich dabei um einen gekoppelten optischen Test, der auf dem von PAGLIA u. VALENTINE (1967) angegebenen Prinzip beruht:

* Detaillierte Untersuchungen zur Methode der GSH-Px-Bestimmung sind im Anhang dargestellt.

250 µl	Hämolysat bzw. Plasma
+ 250 µl	H ₂ O
+ 200 µl	GSH-Reduktase (5 U/ml) in Phosphatpuffer pH 7 mit 2,5 mmol/l EDTA
+ 200 µl	GSH (10 mmol/l)

15 min Vorinkubation bei 37°C

+ 100 µl	NADPH ₂ (2,5 mmol/l) in 0,1 % NaHCO ₃
----------	--

5 min Messung des spontanen NADPH₂-Verbrauchs

+ 100 µl	Cumolhydroperoxid (13 mmol/l)
----------	----------------------------------

Messung des NADPH₂-Umsatzes bei 366 nm (37°C)

Tab. 1: Reaktionsansatz für die photometrische Bestimmung der Glutathion-Peroxidase von Plasma und Erythrozyten.

Um die Spontanreaktion im Ansatz zu berücksichtigen, wurde als Leerwert der analoge Testansatz unter Verwendung von Wasser an Stelle des Hämolysats bzw. Plasmas eingesetzt. Die Enzymbestimmungen im Blut erfolgten jeweils innerhalb von 15 Stunden nach der Entnahme.

Glutathion-Reduktase, NADPH₂, Selenharnstoff und Seleno-DL-Methionin stammten von SIGMA-Chemical Corp., alle übrigen verwendeten Chemikalien von MERCK, Darmstadt.

GSH (in aqua dest.), NADPH₂ (in 0,1 % NaHCO₃-Lösung) und Cumolhydroperoxid (in aqua dest.) wurden maximal eine Woche bei 4°C aufbewahrt. GSH-Reduktase (5 U/ml H₂O) wurde täglich neu angesetzt.

Das Hämolsat wurde nach der Arbeitsvorschrift von GÜNZLER und Mitarb. (1974) hergestellt:

Zu 0,25 ml einer 0,2 mol/l EDTA-Lösung (Äthylendiamin-tetra-essigsäure, Dinatriumsalz) werden 10 ml des entnommenen Blutes zugegeben (EDTA-Konz: 5 mmol/l Blut). Das Plasma wird abzentrifugiert (10 min, 2000 g) und gesondert gemessen. Die Erythrozyten werden dreimal in 5 ml kalter, isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend 0,2 ml der Erythrozyten-suspension in 5 ml Aqua dest. hämolysiert. Die zellulären Partikel werden abzentrifugiert (20 min, 5000 g) und das Hämoly-sat auf 3 g Hb/l eingestellt.

Um den Einfluß der ebenfalls NADPH₂-abhängigen Methämoglobin-Reduktase auf das Meßergebnis zu beseitigen, wird das Hämoglobin in Cyanmethämoglobin überführt:

Zu 1 ml des auf 3 g Hb/l eingestellten Hämolsats werden 250 µl einer Kalium-Ferricyanidlösung (0,9 mmol in 1 mmol/l KH₂PO₄-Lösung) und 250 µl einer KCN-Lösung (9 mmol in 7,5 mmol KH₂PO₄) gegeben.

Die Enzymaktivität (U) wurde im Hämolsat auf 1 g Hämoglobin bezogen und als Umsatz an DADPH₂ (Extinktionskoeffizient bei 366 nm: 3,3 cm/µmol) definiert:

$$1 \text{ U/g Hb} = \frac{\text{E/g Hb min}}{3,3 \text{ µmol}} \quad -$$

Umsatz von 1 µmol NADPH₂/g Hb min (37°C)

Eine Einheit der Enzymaktivität (U) im Plasma entspricht dem Umsatz von 1 µmol NADPH₂/l Plasma min. Der bereinigte Wert der GSH-Px-Aktivität im Plasma und den Erythrozyten ergibt sich aus der Differenz des NADPH₂-Verbrauchs (vor Cumolzugabe) und des NADPH₂-Gesamtumsatzes nach Abzug der Spontanreaktion (Leerwert).

Bei jeder Bestimmung wurden der Hb-Gehalt und der Hämatokrit-Wert des Blutes mitbestimmt. Dadurch konnten auch die Enzymaktivitäten des Gesamtblutes errechnet werden und evtl. Fehler infolge des unterschiedlichen Hb-Wertes und schwankenden Plasmaanteils des Blutes berücksichtigt werden.

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Enzymbestimmung haben wir 20 Parallelbestimmungen der Erythrozyten- und Plasmaaktivität durchgeführt. Bei den Ergebnissen der Erythrozyten-Aktivität ergab sich eine relative Standardabweichung von 4,48 % und für die Werte im Plasma eine relative Standardabweichung von 7,07 %.

Der Einfluß des Alters des Probenmaterials auf die GSH-Px-Aktivität wurde durch Messung der jeweiligen Enzymaktivitäten von vier Proben über vier Tage im Abstand von 24 Stunden ermittelt (Abb. 2 u. 3). Bei den Erythrozyten ergab sich eine Abnahme der Aktivität innerhalb der ersten vier Tage um ca. 50 %. Am ersten Tag nach der Entnahme war bei allen Proben eine leichte Steigerung der Umsatzrate zu erkennen. Die Aktivität im Plasma nahm innerhalb von vier Tagen um ca. 12 % ab.

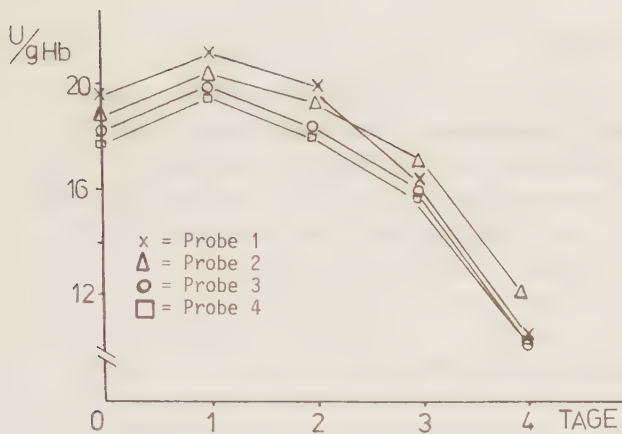


Abb. 2: Abhängigkeit der Glutathion-Peroxidase-Aktivität der Erythrozyten vom Alter der Proben.

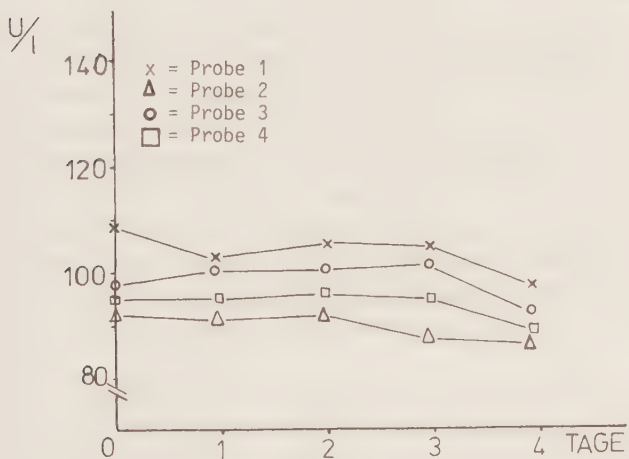


Abb. 3: Abhängigkeit der Glutathion-Peroxidase-Aktivität im Plasma vom Alter der Proben.

III. ERGEBNISSE

Die Selenkonzentrationen von Plasma und Urin des belasteten Kollektivs lagen im Mittel erwartungsgemäß über denen des Vergleichskollektivs. Die auf die Kreatininausscheidung relativierten Urinkonzentrationen betrugen für das Vergleichskollektiv $41 \pm 27 \mu\text{g/g}$ Kreatinin und für das exponierte Kollektiv $59 \pm 43 \mu\text{g/g}$ Kreatinin. Die Plasmakonzentrationen lagen im Vergleichskollektiv bei $82 \pm 16 \mu\text{g/l}$ und im exponierten Kollektiv bei $108 \pm 19 \mu\text{g/l}$. Die prozentualen Verteilungen sind in den Abb. 4 u. 5 zusammengestellt. Statistisch signifikant waren nur die Unterschiede der Plasmakonzentrationen ($t = 3,0$, $p < 0,01$). Zwischen den Plasma- und Urinkonzentrationen beider Kollektive fand sich eine positive Korrelation ($r = 0,43$, $p < 0,05$).

Die Enzymaktivitäten der GSH-Px von Blutplasma und Erythrozyten sowie die Werte der errechneten Gesamtaktivität des Blutes lagen im belasteten Kollektiv ebenfalls deutlich über denen des Vergleichskollektivs (Tab. 2). Unterschiede waren insbesondere zwischen den auf g Hämoglobin bezogenen Enzymaktivitäten der roten Blutkörperchen und in geringerem Umfang auch zwischen denen des Blutplasmas festzustellen. Im belasteten Kollektiv übertrafen die Enzymaktivitäten in den Erythrozyten die des Vergleichskollektivs im Mittel um 22 % und im Plasma im Mittel um 12 %. Die prozentualen Verteilungen sind für beide Kollektive in den Abb. 6 - 8 dargestellt.

Der Anteil der Plasma-Aktivität an der Gesamt-Aktivität der GSH-Px im Blut betrug für beide Kollektive weniger als 2 %. Zwischen den Enzymaktivitäten im Plasma und in den Erythrozyten waren keine Korrelationen zu sichern. Positive Korrelationen fanden sich aber zwischen der Enzymaktivität im Plasma (U/100 ml Blut) und der Selen-Ausscheidung im Urin des belasteten Kollektivs ($r = 0,71$ **, $p < 0,01$) und im Vergleichskol-

lektiv ($r = 0,55^{**}$, $p < 0,01$). Zusätzlich war im Vergleichs-
kollektiv eine signifikante Abhängigkeit der Enzymaktivität
von der Selenkonzentration im Plasma festzustellen ($r = 0,58^{**}$,
 $p < 0,01$), nicht aber im belasteten Kollektiv. Zwischen den
übrigen Parametern bestanden keine sicheren Beziehungen.

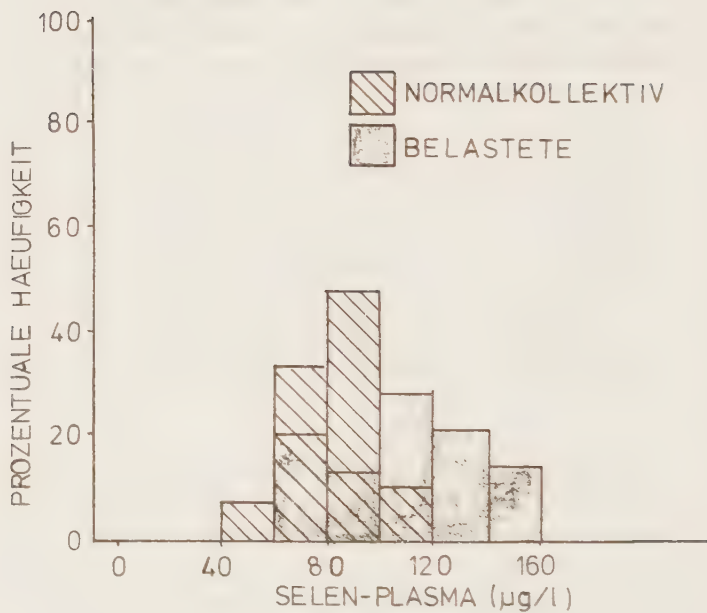


Abb. 4: Prozentuale Verteilungen der Selenkonzentrationen im Plasma bei beruflich Selenbelasteten und Vergleichspersonen

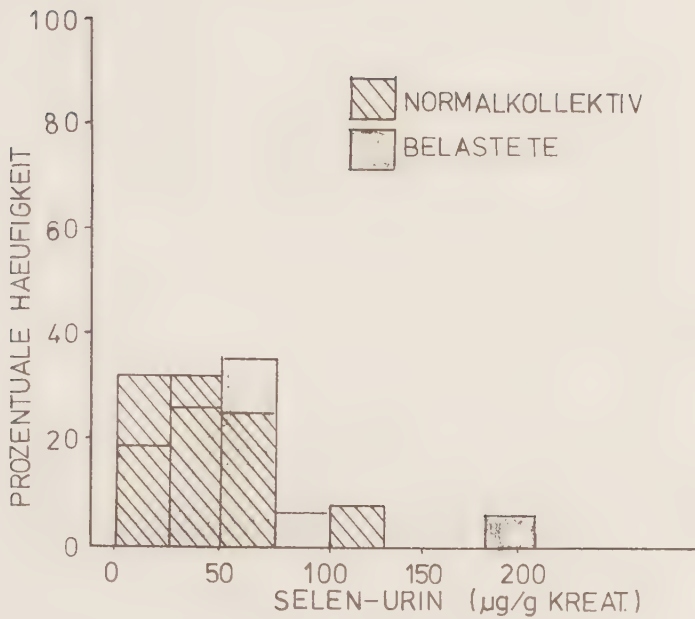


Abb. 5: Prozentuale Verteilungen der Selenkonzentrationen im Urin bei beruflich Selenbelasteten und Vergleichspersonen

	VERGLEICHSKOLLEKTIV (N = 65)	BELASTETE (N = 14)		T-WERT
GSH-Px (U/G HB)	17 + 1,8	21 + 1,3	22,5 %	7,8***
GSH-Px (U/L PLASMA)	90 + 17	101 + 14	12 %	2,2*
GSH-Px (U/100 ML BLUT)	280 + 37	356 + 32	27 %	7,1***

Tabelle 2: Die Glutathion-Peroxidase-Aktivitäten von Plasma und Erythrozyten bei beruflich Selenbelasteten und Vergleichspersonen (Mittelwerte und Standardabweichungen, prozentuale Unterschiede der Mittelwerte und Signifikanzniveaus der Unterschiede).

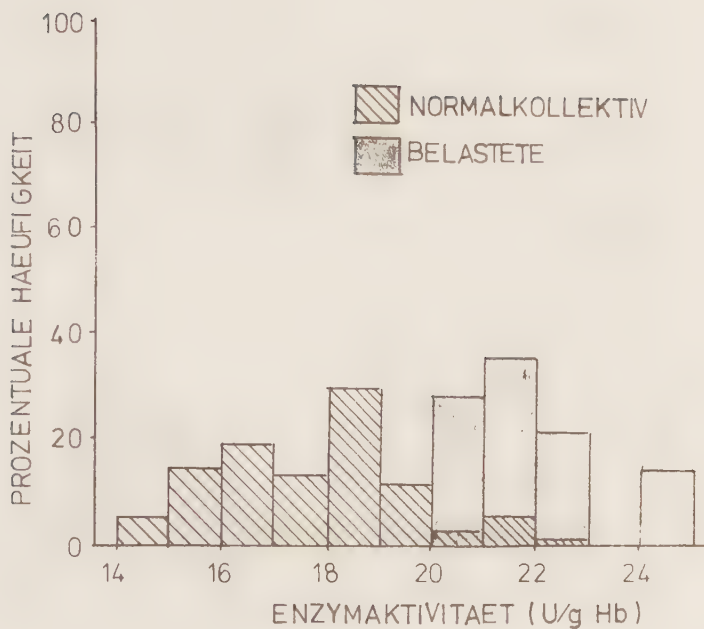


Abb. 6: Die Aktivität der Glutathion-Peroxidase der Erythrozyten (bezogen auf g Hämoglobin) bei beruflich Selen-belasteten und Vergleichspersonen.

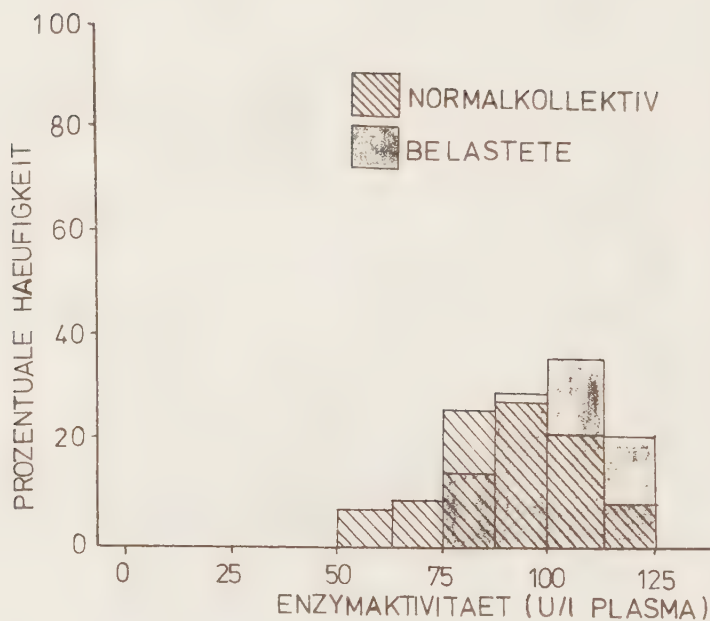


Abb. 7: Die Aktivität der Glutathion-Peroxidase im Plasma bei beruflich Selen-belasteten und Vergleichspersonen.

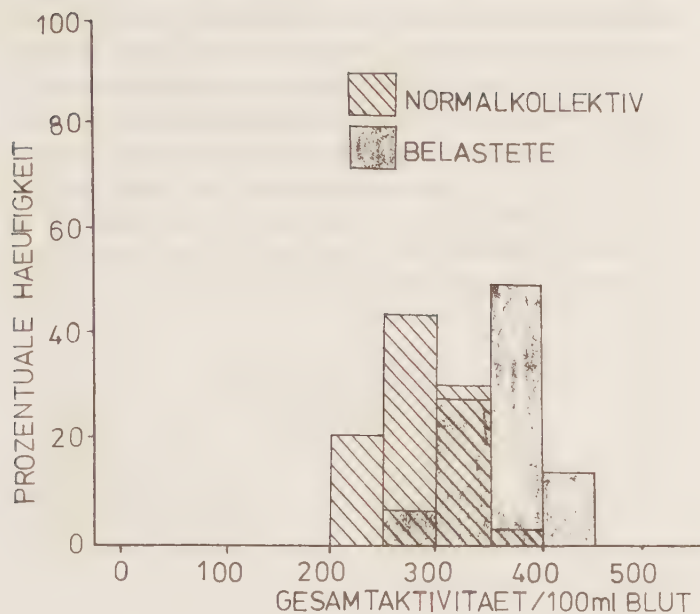


Abb. 8: Die Aktivität der Glutathion-Peroxidase bezogen auf 100 ml Blut bei beruflich Selen-belasteten und Vergleichspersonen.

IV. DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Nach den Untersuchungsergebnissen ist die GSH-Px-Aktivität im Blutplasma auch ein geeigneter Parameter zur Abschätzung der beruflichen Selenbelastung zumindest auf Gruppenbasis. Dabei scheint die Enzymbestimmung - abgesehen von der einfachen Analytik - gegenüber der Messung der Selenkonzentration im biologischen Material keinen größeren Aussagewert zu besitzen. Schwierig ist vor allem die Beantwortung der Frage, welche medizinische Relevanz einer erhöhten Aktivität des Enzyms im Organismus zuzusprechen ist. Das Enzym dient der Zerstörung verschiedener Peroxide in der Zelle.

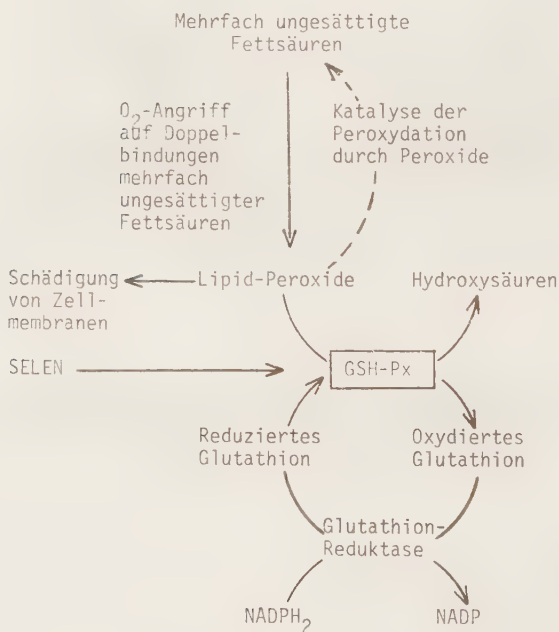


Abb. 9: Funktion des Selens und der GSH-Px im Organismus
(Nach GANTHER und HOEKSTRA 1974)

Die quantitative Bedeutung dieser Wirkung für den Organismus im Vergleich zu der anderer Enzyme mit ähnlicher Funktion, wie z. B. der Catalase (EC 1.11.1.6) oder der Peroxodismutase (EC 1.15.1.1) ist dabei noch ungewiß und wird unterschiedlich beurteilt (COHEN u. HOCHSTEIN 1963 und MARAL u. Mitarb. 1977). Die GSH-Px scheint aber bereits bei niedrigen Peroxidkonzentrationen wirksam zu werden und insbesondere für die Zerstörung von Fettsäure-Peroxiden (Abb. 9) wichtig zu sein (LITTLE u. O'BRIEN 1968).

Der vermutete Reaktionsmechanismus (s.o.) könnte die in Abb. 10 zusammengestellten Symptome von Patienten mit einer erniedrigten GSH-Px-Aktivität erklären, die medizinische

Symptomatik	GSH-Px (% der Aktivität von Normalwerten)	
Hämolytische Anämien "Heinz bodies"	vermindert	NECHELES u. Mitarb. (1969)
Hämolytische Anämie	53 %	STEINBERG u. Mitarb. (1970)
Leberfunktionsstörung Akanthozytosis	vermindert	GHARIB (1968)
Chron. hämolytische Anämie, Meth.-Hb "Heinz bodies"	30 %	BOIVIN u. Mitarb. (1969)
Hämolytische Anämie	17 %	NISHIMURA u. Mitarb. (1972)
Gesteigerte Thrombo- zytenaggregation	vermindert	SCHWARTZ u. Mitarb. (1974)

Abb. 10: Beobachtete Symptome bei Patienten mit einer genetisch bedingten verminderten Aktivität der Glutathion-Peroxidase.

Bewertung der gesteigerten Aktivität des Enzyms bei dem belasteten Kollektiv bleibt jedoch problematisch.

Eine Erhöhung der Umsatzrate der GSH-Px ist aber sicher nicht als adverser Effekt - also als schädliche Wirkung - einzustufen, sondern eher positiv zu beurteilen. Interessant ist dabei der Befund von THOMPSON u. Mitarb. (1977), daß die GSH-Px-Aktivität im Blut bei Selenkonzentrationen von mehr als 100 µg/l Plasma nicht mehr nennenswert gesteigert wird. Die festgestellte höhere Aktivität des Enzyms bei dem beruflich exponierten Kollektiv ließe sich daher als mögliche Folge eines latenten Selenmangels in der Vergleichsgruppe bewerten.

Als interessanten Nebebefund ergab sich bei in vitro-Untersuchungen, daß Selen auch eine eigene, Enzym-unabhängige katalytische Wirkung bei dem Abbau von Hydroperoxiden besitzt (Abb. 11). Peroxidatische Eigenschaften zeigte dabei aber nur das Natriumselenit. Die organischen Selenverbindungen Selenharnstoff und Selen-DL-Methionin erwiesen sich hingegen als inaktiv.

Die Bedeutung der katalytischen Aktivität des Selens ist noch nicht geklärt. Man vermutet, daß Selenit, Selenat und Selenocystein an der Reduktion von Methämoglobin beteiligt sind (MASUKAWA u. IWATA 1977).

Die in unseren Untersuchungen gefundenen erhöhten Umsatzraten im Blut des belasteten Kollektivs können jedoch nicht allein mit der Eigenaktivität des Selens erklärt werden. Der Anteil des nichtenzymatischen Cumolhydroperoxidumsatzes würde - unter der Voraussetzung, daß Selen in einer katalytisch wirksamen Form vorliegt - im Plasma nur ca. 1/10 und bei den Erythrozyten ca. 1/500 der Gesamtaktivität betragen.

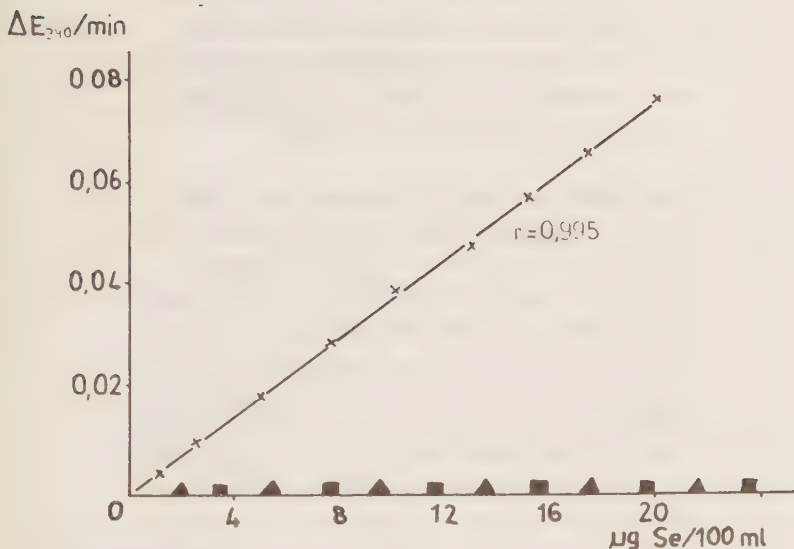


Abb. 11: Nichtenzymatische, katalytische Eigenschaft von Selenit.
Die Versuchsanordnung entspricht dem des zur Bestimmung der GSH-Px-Aktivität verwendeten Ansatzes. An Stelle von Plasma bzw. Hämolysat wurden entsprechende Selenverbindungen in bekannten Konzentrationen zugegeben. Zeichenerklärung:
x — x = Selenit; ■ — ■ = Selenharnstoff;
▲ — ▲ = Se-DL-Methionin.

Aus den Untersuchungsergebnissen lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

- a) Die Aktivität der GSH-Px im Plasma ist ein geeigneter Parameter der Selenbelastung. Die Aktivität des Enzyms in den Erythrozyten ist bei beruflicher Selenbelastung ebenfalls erhöht, zeigt aber keine Abhängigkeit von der Selenkonzentration im Plasma und Urin.

b) Eine 'pathologisch' gesteigerte GSH-Px-Aktivität der belasteten Personengruppe ist kaum anzunehmen. Die erhöhten Werte könnten eher positiv beurteilt werden und für einen latenten Selenmangel in der Vergleichsgruppe sprechen.

c) Selen besitzt zusätzlich enzymunabhängige katalytische Eigenschaften, deren Anteil am Umsatz von Peroxiden aber im Vergleich zur Enzymaktivität gering ist. Weitere biologische Funktionen im Organismus sind nicht gesichert.

Ob ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung der Glutathion-Peroxidase und der nach neueren Studien möglichen krebsschutzprotektiven Eigenschaften des Selens besteht, ist bisher noch ungeklärt. SHAMBERGER u. Mitarb. (1976) halten es aber für möglich, daß durch das Enzym ein Schutz gegenüber kanzerogenen Produkten der peroxidativen Gewebsschädigung, z. B. Malonaldehyd, ausgeübt wird. Es erscheint aber unwahrscheinlich, daß dieser Mechanismus die generelle Ursache der krebsschutzprotektiven Wirkung des Selens darstellen sollte. Wahrscheinlicher ist es, daß Selen selbst in organischer Bindung als nukleophiles Agens gegen kanzerogene elektrophile Verbindungen wirkt (GANTHER u. Mitarb. 1976). Prospektive Untersuchungen über die Wirkung einer langjährigen beruflichen Selenexposition stehen noch aus. Sollte sich Selen auch in Zukunft als krebsschutzprotektiver Stoff erweisen, so wäre ihm als erster gesundheitsförderlicher Arbeitsstoff in jedem Fall eine arbeitsmedizinische Sonderstellung sicher.

V. ANHANG

METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BESTIMMUNG DER

GLUTATHION-PEROXIDASE-AKTIVITÄT

Abhängigkeit der Enzymaktivität von der eingesetzten Hämolysatkonzentration und der Plasmamenge

Die von FLOHE und GÖNZLER (1974) verwendete Hämolysatkonzentrationen im Ansatz (1 g Hb/l) mußte halbiert werden, da sich bereits bei Konzentrationen über 0,8 g Hb/l starke Schwankungen der Resultate ergaben. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration im Ansatz wurde sogar ein Abfall der Aktivität beobachtet (Abb. 12).

$\Delta E/\text{min}$

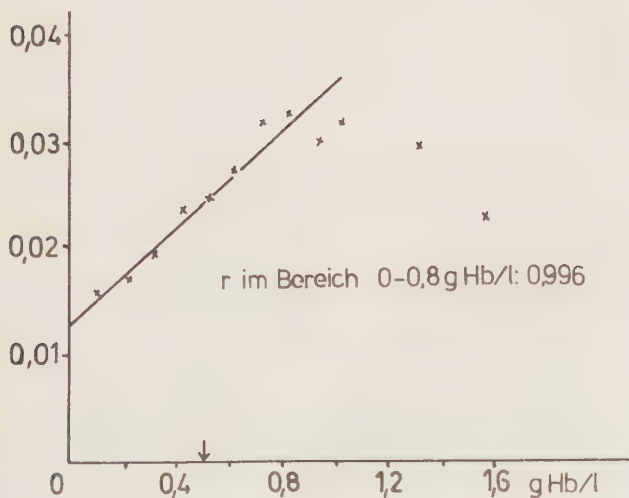


Abb. 12: Abhängigkeit der Extinktionsänderung/min von der Hämolysatkonzentration. ↓ = Verwendete Konzentration bei allen weiteren Bestimmungen.

Aus demselben Grund mußte auch die Plasmamenge im Reaktionsansatz von 0,5 ml auf 0,25 ml reduziert werden.

Abhängigkeit der Enzymaktivität von der NADPH_2 -Konzentration

Eine Veränderung der NADPH_2 -Konzentration (0,25 mmol) im Ansatzvolumen um $\pm 50\%$ ergab keine signifikante Aktivitätsänderung.

Abhängigkeit von der Glutathion-Konzentration

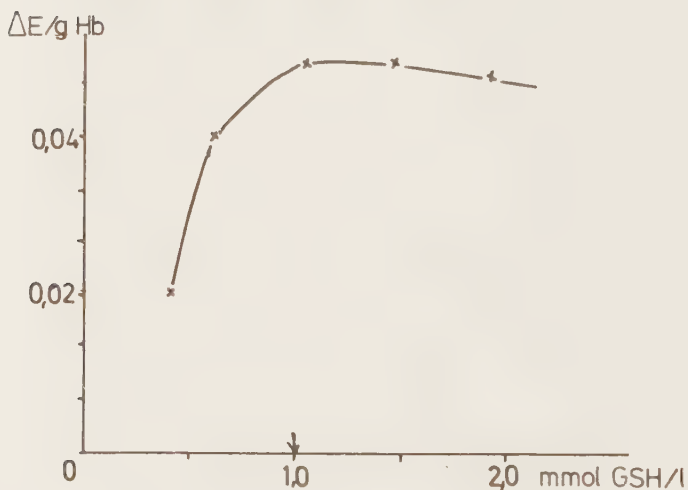


Abb. 13: Abhängigkeit der Extinktionsänderung/min g Hb von der Glutathion-Konzentration. ↓ = Verwendete Konzentration bei allen weiteren Bestimmungen.

Die Glutathion-Konzentration von 1 mmol/l im Ansatz konnte nicht gesteigert werden, da bei höheren Werten die von FLOHE u. BRAND (1974) beschriebene Hemmung der Glutathion-Reduktase durch (GSH-) Substratüberschuß auftrat.

Abhängigkeit von der Cumolhydroperoxidkonzentration

Die GSH-Px zeigt hinsichtlich der Peroxide eine relativ geringe Substratspezifität. Somit können für die Bestimmung der Aktivität des Enzyms zahlreiche Peroxide verwendet werden. PAGLIA u. VALENTINE (1967) benutzten H_2O_2 , LITTLE u. OLIESCU (1970) Cumolhydroperoxid, FLOHE u. Mitarb. t-Butylhydroperoxid bei den jeweiligen Bestimmungsverfahren.

Bei der Wahl des Hydroperoxids und seiner Konzentration im Ansatz ergibt sich folgende Problematik:

- 1) Die Konzentration muß hoch genug gewählt werden, um eine Sättigung der GSH-Px mit Substrat zu ermöglichen, so daß ein Reaktionsablauf annähernd nullter Ordnung erreicht werden kann.
- 2) Bei steigender Peroxidkonzentration nimmt aber die Spontanoxidation von GSH durch Peroxide zu, so daß eine exakte Bestimmung der Enzymaktivität erschwert wird. Eine Denaturierung des Enzyms könnte ebenfalls die Folge sein. Eine vollständige Substratsättigung kann deshalb nicht angestrebt werden.

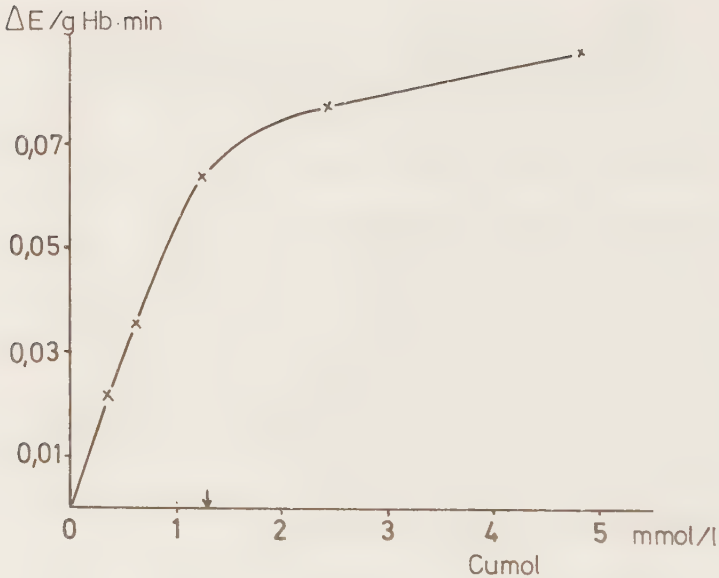


Abb. 14: Abhängigkeit der Extinktionsänderung von der Cumolhydroperoxidkonzentration. ↓ = Im Test verwendete Konz. Um eine eventuelle Limitierung der Reaktionsgeschwindigkeit durch die GSH-Red. auszuschließen, wurden im Bereich der höheren Umsatzraten die Bestimmungen auch mit höheren GSH-Red.-Konzentrationen durchgeführt. Es ergab sich dabei keine Änderung der Umsatzrate.

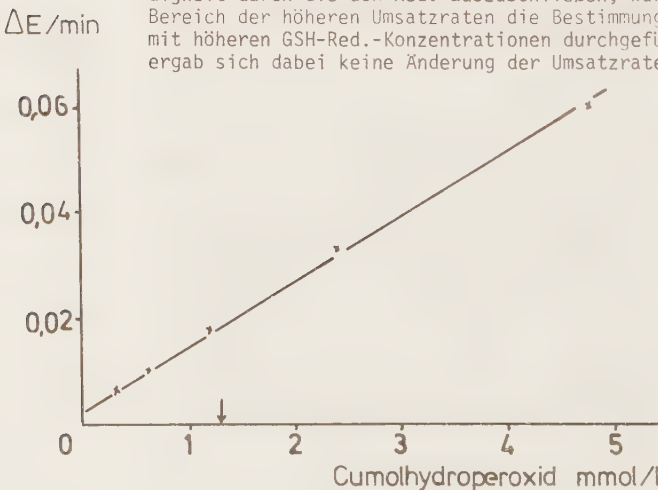


Abb. 15: Spontanoxidation von GSH bei steigenden Cumolhydroperoxidkonzentrationen im Leerwert. ↓ = Im Test verwendete Konzentration.

GÖNZLER und FLOHE untersuchten 1972 eingehend die Reaktion der GSH-Px mit verschiedenen Hydroperoxiden. Die Abstufungen der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die jeweiligen Akzeptorsubstrate ($\text{H}_2\text{O}_2 > \text{Äthylhydroperoxid} > \text{Cumolhydroperoxid} > \text{t-Butylhydroperoxid}$) entsprachen dabei weitgehend der relativen spontanen Reaktionsneigung der Peroxide, wie z. B. bei der nichtenzymatischen Oxydation von GSH ersichtlich wird (Leerwert). GÖNZLER und FLOHE gelangten deshalb zu der Auffassung, daß die unterschiedlichen Reaktionsraten der Peroxidase mit den verschiedenen Hydroperoxiden eher durch deren zunehmende Reaktionsträgheit (z. B. durch sterische Abschirmung) bedingt sind als durch veränderte Neigung zur Bildung eines speziellen Enzym-Substrat-Komplexes.

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur

$\Delta E / \text{g Hb} \cdot \text{min}$

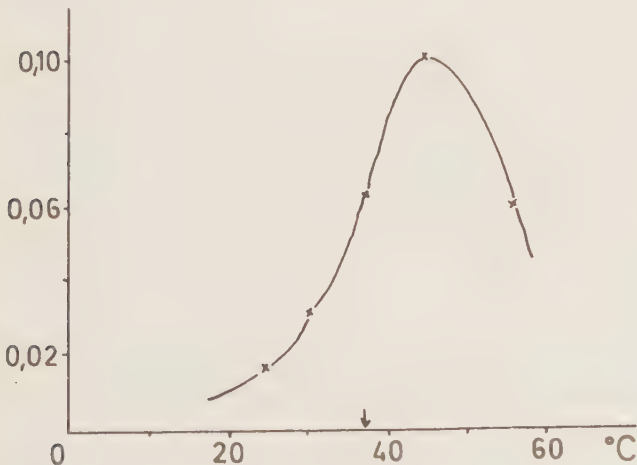


Abb. 16: Temperaturabhängigkeit der Umsatzrate. ↓ = Im Test verwendete Temperatur. Bei steigenden Temperaturen kommt es zu einer zunehmenden Spontanoxydation von GSH.

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert

Bei der Bestimmung der Umsatzrate in Abhängigkeit vom pH-Wert muß folgendes berücksichtigt werden:

- 1) Die nichtenzymatische Umsatzrate wächst mit steigendem pH.
- 2) Die GSH-Red. ist ebenfalls vom pH-Wert im Ansatz abhängig. Es wurden deshalb die Bestimmungen versuchsweise auch mit höheren GSH-Red-Konzentrationen durchgeführt, um einen Einfluß der GSH-Red auf die Reaktionsgeschwindigkeit möglichst gering zu halten.

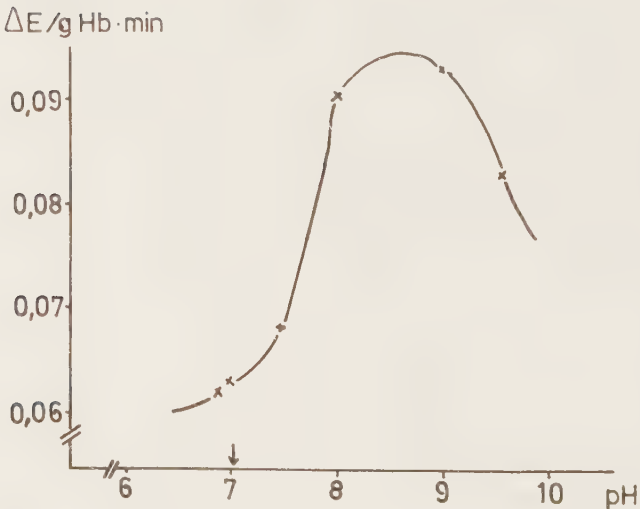


Abb. 17: Abhängigkeit der Umsatzrate vom pH-Wert. ↓ = Im Test verwendete Konzentration.

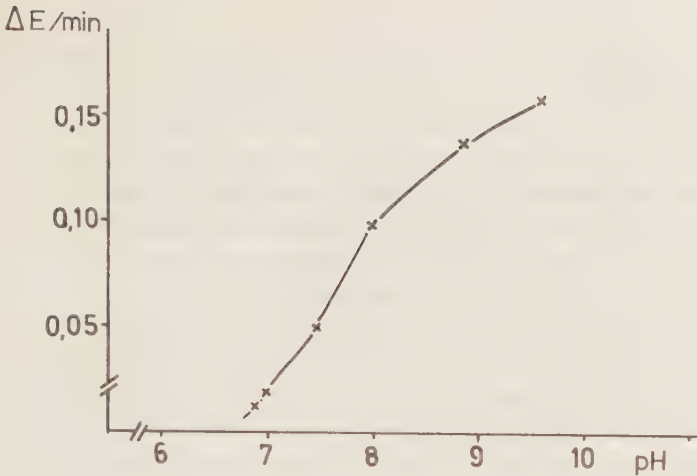


Abb. 18: Abhängigkeit der Spontanoxydation von Glutathion bei steigenden pH-Werten. Da bei pH 7 die Spontanoxydationsrate noch relativ gering ist, wurde dieser Wert für die GSH-Px-Aktivitätsbestimmungen verwendet.

Das pH-Optimum bei ca. 8,6 entspricht etwa den von FLOHE 1972 (pH-Opt. 8,8) und von BEUTLER 1975 (pH-Opt. 8,5) ermittelten Werten. Die Befunde stimmen auch mit den Ergebnissen von MILLS (1959) überein, der - bei Verwendung angereicherter Glutathion-Peroxidase - ein pH-Optimum um 8 und eine rapide Zunahme der nichtenzymatischen Reaktionsrate ab einem pH-Wert von 7,0 beobachtete.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Selen besitzt aufgrund seiner niedrigen chronischen Toxizität eine nur geringe arbeitsmedizinische Bedeutung. Als biochemischer Indikator der ökologischen Selenaufnahme wird eine Aktivierung des Enzyms Glutathion-Peroxidase beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden eine photometrische Methode zur Messung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität von Plasma und Erythrozyten entwickelt, sowie verschiedene Einflußfaktoren auf das Enzym untersucht.

In einer vergleichenden Studie fanden sich für ein Kollektiv mit langjähriger beruflicher Exposition gegenüber Selen ($n = 14$) signifikant höhere Aktivitäten des Enzyms in den Erythrozyten ($21,8 \pm 1,3$ U/g Hb gegenüber $17,8 \pm 1,8$ U/g Hb) und im Blutplasma (101 ± 14 U/l gegenüber 90 ± 17 U/l) als für eine Vergleichsgruppe ($n = 65$) ohne berufliche Selen-Exposition (t-Wert für die Aktivität in den Erythrozyten: $7,8^{***}$ bzw. für die Plasmaaktivität $2,2^*$). Die Konzentrationen von Selen im Plasma unterschieden sich für beide Kollektive erwartungsgemäß ebenfalls (Belastete: 108 ± 29 µg/l, Unbelastete: 82 ± 16 µg/l, $t = 3,0^{**}$, $p < 0,01$). Die Selen-Ausscheidung mit dem Urin lag für das belastete Kollektiv mit 59 ± 43 µg/g Kreatinin nicht signifikant über den Werten des Vergleichskollektivs (41 ± 27 µg/g Kreatinin). Zwischen den Selenkonzentrationen im Urin und Plasma bestanden jedoch in beiden Kollektiven signifikante Korrelationen (Belastete: $r = 0,43^*$, $p < 0,05$, Unbelastete: $r = 0,54^{**}$, $p < 0,01$). Zusätzlich war in der Vergleichsgruppe eine signifikante Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Selenkonzentration im Plasma festzustellen ($r = 0,58^{**}$, $p < 0,01$). Die Bedeutung erhöhter Aktivitäten der Glutathion-Peroxidase - u.a. im Hinblick auf die möglichen Krebs-protektiven Eigenschaften des Selen - wird diskutiert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- BEUTLER, E.,
Y.C. AWASTHI,
S.K. SRIVASTAVA : Purifikation and properties of
human erythrocyte glutathione
peroxidase
J. Biol. Chem. Vol. 250, No. 13
pp. 5144 - 5149 (1975)
- BOIVIN, P.,
C. GALAND,
J. ROGE,
N. GUEROULT : Anémie hémolytique avec déficit
en glutathion peroxidase chez
un adulte
Enzymol. Biolog. Clin 10,
68 - 80 (1969)
- BROGHAMER, W.J.,
K.P. McCONNEL,
A.L. BLOTCKY : Relationship between serum sele-
nium levels and patients with
carcinoma
Cancer 37, 1384 - 1388 (1976)
- COHEN, G.,
P. HOCHSTEIN : Glutathione peroxidase: The
primary agent for the elimination
of hydrogen peroxide in
erythrocytes
Biochemistry 2, 1420 - 1428 (1963)
- FLOHE, L.,
I. BRAND : Some hints to avoid pitfalls in
quantitative determination of
glutathione peroxidase
Z. klin. Chem. u. Biochem. 8. Jg.
156 - 161 (1970)
- GANTHER, H.E.,
D.G. HAFEMAN,
R.A. LAWRENCE,
R.E. SERFASS,
W.G. HOEKSTRA : Selenium and glutathione peroxi-
dase in health and disease
- a review
In: Trace elements in human health
and disease, Vol II: Essential
and toxic elements
Ed. by A.S. Prasad and D. Oberleas
Chptr. 32, pp. 165 - 234
Academic Press, New York, San
Francisco, London 1976

- GHARIB, H.,
V.F. FAIRBANKS,
L.G. BARTHOLOMEW : Proc. Staff. Meet. Mayo Clin.
44, 96 - 101 (1968),
Zit. bei GANTHER u. Mitarb. 1976
- GÜNZLER, W.A.,
H. KREMERS,
L. FLOHE : Glutathion-Peroxidase, VI.
Die Reaktion der Glutathion-
Peroxidase mit verschiedenen
Hydroperoxiden
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
Bd. 353, 1001 - 1004 (1972)
- GÜNZLER, W.A.,
H. KREMERS,
L. FLOHE : An improved coupled test procedure
for glutathione peroxidase (EC
1.11.1.9.) in blood
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12, 444 - 448 (1974)
- JAKOBS, M.M. : Inhibitory effects of selenium on
1,2-dimethylhydrazine and methyl-
azomethanol colon carcinogenesis.
Correlative studies on selenium
effects on the mutagenicity and
sister chromatid exchange rates
of selected carcinogens
Cancer 40, 2557 - 2564 (1977)
- KEYSSER, M. : Berufliche Vergiftungen mit anor-
ganischen Selenverbindungen
Dtsch. Gesundheitsw. 20, 766 (1965)
- LITTLE, C.,
R. OLINESCU,
K.G. REID,
P.J. O'BRIEN : Properties and regulation of glu-
tathione peroxidase
J. Biol. Chem. Vol. 245, 14,
pp. 3632 - 3636 (1970)
- LITTLE, C.,
P.J. O'BRIEN : An intracellular GSH-peroxidase
with a lipid peroxidase substrate
Biochem. Biophys. Res. Commun.
31, 145 - 150 (1968)

- LOMBECK, I.,
KASPAREK, K.,
H.D. HARBISCH,
L.E. FEINENDEGEN,
H.J. BREMER
- : The selenium state of healthy children
I. Serum selenium concentration at different ages;
activity of glutathione peroxidase of erythrocytes at different ages;
Selenium content of food of infants.
Europ. J. Pediat. 125, 81 - 88 (1977)
- LOMBECK, I.,
K. KASPAREK,
H.D. HARBISCH,
K. BECKER,
E. SCHUHMANN,
W. SCHRÖTER,
L.E. FEINENDEGEN,
H.J. BREMER
- : The selenium state of children
II. Selenium content of serum, whole blood, hair and the activity of erythrocyte glutathione peroxidase in dietetically treated patients with phenylketonuria and maple-sirup-urine disease
Europ. J. Pediatr. 128, 213 - 223 (1978)
- MARAL, J.,
K. PUGET,
A.M. MICHELSON
- : Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 77, 1525 - 1535 (1977)
- MASUKAWA, T.,
H. IWATA
- : Catalytic action of selenium in the reduction of methemoglobin by glutathione.
Life Sciences, Vol. 21, No. 5 pp. 695 - 700 (1977)
- McKENZIE, R.L.,
H.M. REA,
Ch.D. THOMSON,
M.F. ROBINSON
- : Selenium concentration and glutathione peroxidase activity in blood of New Zealand infants and children.
Am. J. Clin. Nutr. 31, 1413 - 1418 (1978)
- MILLS, G.C.
- : The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes.
J. Biol. Chem. 243, 502 - 506 (1959)

- NECHELES, T.F.,
N. MALDONADO,
A. BARQUET-CHEDIAK
D.M. ALLEN : Blood, 33, 164 - 169 (1969),
zit. bei GANTHER u. Mitarb. 1976
- NISHIMURA, Y.,
N. CHIDA,
T. HAYASHI,
T. ARAKAWA : Tohoku J. Exp. Med. 108,
207 - 217 (1972),
zit. bei GANTHER u. Mitarb. 1976
- OMAYE, St. T.,
A.L. TAPPEL : Effects of dietary selenium on
glutathione peroxidase in the
chick.
J. Nutr. 104, 747 - 753 (1974)
- PAGLIA, D.E.,
W.N. VALENTINE : Studies on the quantitative and
qualitative characterization on
erythrocyte glutathione peroxi-
dase.
J. Lab. Clin. Med. 70, 158 - 169
(1967)
- PERONA, G.,
R. CELLERINO,
G.C. GUIDI,
G. MOSCHINI,
B.M. STIEVANO,
C. TREGNAGHI : Erythrocytic glutathione peroxidase:
Its relationship to plasma
selenium in man.
Scand. J. Haematol. 19,
116 - 120 (1977)
- SCHALLER, K.H.,
SCHWAIGER, H. : Bestimmungen von Selen in bio-
logischem Material mit verschie-
denen Atomabsorptionstechniken.
Beckmann Report, 1/78, 15 (1978)
- SCHMIDT, K.H.,
W. HELLER : Selenkonzentration und Aktivität
der Glutathionperoxidase im Lysat
menschlicher Erythrozyten.
Blut 33, 247 - 251 (1976)
- SCHRAUZER, G.N. : Medic. Hypoth. 2, 39 (1976)
zit. bei SCHRAUZER u. Mitarb.
1978

- SCHRAUZER, G.N.,
D.A. WHITE,
C.J. SCHNEIDER : Cancer mortality correlation
studies - III: Statistical
associations with dietary
selenium intakes
Bioinorganic Chemistry 7,
23 - 34 (1977 a)
- SCHRAUZER, G.N.,
D.A. WHITE,
C.J. SCHNEIDER : Cancer mortality correlation
studies - IV: Associations with
dietary intakes and blood levels
of certain trace elements
notably Se-antagonists.
Bioinorganic Chemistry 7,
35 - 56 (1977 b)
- SCHRAUZER, G.N.,
D.A. WHITE : Selenium in human nutrition:
Dietary intakes and effects of
supplementation
Bioinorganic Chemistry 8,
303 - 318 (1978)
- SCHROEDER, H.A.,
D.V. FROST,
J.J. BALASSA : Essential trace metals in man:
selenium.
J. chron. Dis. 23, 227 - 243
(1970)
- SCHWARTZ, J.P.,
A.A. COOPERBERG,
A. ROSENBERG : Brit. J. Haematol. 27, 273 - 280
(1974)
zit. bei GANTHER u. Mitarb. 1976
- SHAMBERGER, R.J.,
St.A. TYTKO,
Ch.E. WILLIS : Antitoxidants and cancer,
Part. VI. Selenium and age-
adjusted human cancer mortality
Arch. Environ. Hlth. 31,
231 - 235 (1976)
- SIVERTSON, T.,
J.T. KARLSEN,
A. FRØSLIE : The relationship of erythrocyte
glutathione peroxidase to blood
selenium in swine
Acta vet. scand. 18, 494 - 500
(1977)
- STADTMAN, Th.C. : Selenium Biochemistry
Science 183, 915 - 922 (1974)

- STEINBERG, M.H., : Acute hemolytic anemia with
M.J. BRAUER, glutathione-peroxidase deficiency
T.F. NECHELESS Arch. Intern. Med. 125,
302 - 303 (1970)
- THOMSON, Ch.D., : Selenium concentration and glu-
H.M. REA, tathione peroxidase activities
V.M. DOESBURG, in whole blood of New Zealand
M.F. ROBINSON residents
Brit. J. Nutr. 37, 457 - 460
(1977)

Lebenslauf:

Am 7. März 1947 wurde ich als zweites Kind des Landwirts Friedrich Frank und seiner Ehefrau Emma, geb. Schein, in Ehingen geboren. Von 1953 bis 1961 besuchte ich die Volksschule in Ehingen und anschließend von 1961 bis 1963 die Landwirtschaftliche Berufsschule in Wassertrüdingen. Nach dem Besuch der Landwirtschaftsschule in Dinkelsbühl während der Winterhalbjahre 1965/66 und 1966/67 legte ich am 30. 3. 1967 die landwirtschaftliche Gehilfenprüfung ab.

Von 1969 bis 1971 beteiligte ich mich am Kurs III des "Telekollegs" des Bayerischen Rundfunks, den ich mit der Fachschulreife abschloß. Seit der Entlassung aus der Volksschule bis zum Eintritt in das "Nürnberg-Kolleg" im Oktober 1971 war ich beruflich in dem landwirtschaftlichen Betrieb meiner Eltern tätig. Im März 1974 erwarb ich am "Nürnberg-Kolleg" die Hochschulreife.

Im Wintersemester 1974/75 begann ich das Medizinstudium an der Universität Erlangen-Nürnberg, an der ich am 27. August 1976 die Ärztliche Vorprüfung, sowie am 20. September 1977 die erste Ärztliche Prüfung und am 6. September 1979 die zweite Ärztliche Prüfung ablegte. Nach dem 12. Semester meldete ich mich zum letzten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, die ich am 23. Oktober 1980 bestand.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr.30
Tel. 09131-26197